Die Reindarstellung des reduzierenden Stoffes aus Zitronen- sowie aus Orangenschalen und seine Identität mit dem Vitamin C.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt a. Main

vorgelegt von

Erich Helm

aus Wethau bei Naumburg/S.

1935

Gatzer & Hahn, Graphische Werkstätten, Schramberg (Schwarzwald)

Referent: Professor Dr. J. Tillmans.

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 1934.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547409_0073

Inhaltsverzeichnis.

1. **Einleitung.** 1

2. **Ueber das Reduktionsvermögen in den Schalen von Orangen und Zitronen.** 1
   a) Allgemeine Arbeitsrichtlinien. 1
   b) Das Verhalten des reduzierenden Stoffes in Zitronen- und Orangenschalen und seine Verteilung in der ganzen Frucht. 2
   c) Beobachtungen und Versuche, die darauf hinweisen, daß es sich bei dem reduzierenden Körper um Vitamin C handelt. 3
   d) Zerstörung des Reduktionsvermögens durch Einwirkungen von Enzymen oder Mikroorganismen. 5

3. **Die Reindarstellung des reduzierenden Stoffes.** 7
   a) Auszüge. 7
   b) Das Eindampfen der Auszüge. 10
   c) Die Acetonfällung. 11
   d) Die saure Bleifällung. 12
   e) Die Aetherfällung. 13
   f) Die neutrale und acetonische Bleifällung. 14
   g) Der Kristallisationsansatz. 15
   h) Zusammenfassung des Arbeitsganges an Hand eines Beispieles. 16

4. **Der isolierte reduzierende Körper wird als Vitamin C identifiziert.** 19

5. **Zusammenfassung.** 20

Einleitung.

Schon H. Nink (1) stellte in unserem Institute, anschließend an die Untersuchungen über das Reduktionsvermögen der Gewürze gegen 2,6-Dichlorphenolindophenol fest, daß nicht nur der Saft von Orangen und Zitronen, sondern auch die Schalen dieser Früchte, und zwar in größerer Menge als der Saft, reduzierende Stoffe enthalten. Neuerdings haben A. L. Bacharach, P. M. Cook und C. L. Smith (2), allerdings wohl ohne die Arbeit von Nink (1) zu kennen, ihre Befunde vollauf bestätigt.

W. Hirsch (3) hat im selben Institute durch eine Arbeit bewiesen, daß der reduzierende Körper im Safte dieser Früchte identisch ist mit Vitamin C.

Es fragte sich nun, ob das Reduktionsvermögen dieser Fruchtschalen auch auf Anwesenheit von Vitamin C beruht, oder ob es durch irgend einen anderen Körper bedingt wird. Das zu klären war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

Zu diesem Zwecke wurde versucht, den reduzierenden Stoff zu isolieren und auf chemischem Wege zu identifizieren. Es wurde nach einem Arbeitsgange verfahren, der bereits mit demselben Ziele von R. Vaubel (4) erfolgreich für Hagebutten ausgearbeitet worden war. Natürlich bedingte die Verschiedenheit des Ausgangsmaterials auch Abänderungen der Methode.

2. Ueber das Reduktionsvermögen in den Schalen von Orangen und Zitronen.

a) Allgemeine Arbeitsrichtlinien.

Als Leitreaktion wurde die reduzierende Wirkung des unbekannten Stoffes gegen 2,6-Dichlorphenolindophenol benutzt. Die Titration mit der Farblösung nach Tillmans wurde in bekannter Weise ausgeführt. Die Auszüge waren stets so beschaffen, daß ohne Nitrobenzol *) titriert werden konnte. Sowohl im roten Gebiet des Farbstoffes ($p_H < 5$) als auch im blauen ($p_H > 5$) wurden gleiche Titrationswerte erhalten.

Es ist selbstverständlich, daß bei allen vorgenommenen Reaktionen unter möglichst weitgehendem Ausschluß von Sauerstoff gearbeitet wurde. Der Bombenstickstoff und die Kohlensäure, die Verwendung fanden, waren durch die üblichen Waschflaschen gereinigt.

*) Ausführungsweise siehe Arbeit von F. Siebert (5).

Das Eindampfen von Lösungen wurde immer im Vakuum unter Durchleiten eines Stickstoffstromes durch die Siedekapillare und Erwärmen im Wasserbade vorgenommen. Bei den letzten Versuchen war die Temperatur niemals höher als 75 Grad Celsius.

Das scheinbare Aequivalentgewicht errechnet sich aus Trokkensubstanzgehalt und dem mit der Farblösung gefundenen Reduktionsvermögen der betreffenden Probe. Es ist ein Maß für die Reinheit des reduzierenden Körpers in dem betreffenden Präparat. Näheres hierüber findet man in der Arbeit von W. Hirsch (3).

b) Das Verhalten des reduzierenden Stoffes in Zitronen- und Orangenschalen und seine Verteilung in der ganzen Frucht.

Die Gesamtmenge des reduzierenden Stoffes einer Zitrone oder Orange ist proportional der Größe der Frucht. Weiterhin ist sie auch verschieden groß in den einzelnen Reifestadien. Die Untersuchungen mit Früchten verschiedener Reife konnten nicht mit größeren Mengen durchgeführt werden, da diese schlecht zu beschaffen waren. Aber an einzelnen zufällig erhaltenen, mehr oder weniger reifen Früchten wurde beobachtet, daß noch verhältnismäßig grüne Früchte weniger reduzieren als reife. Durch zu langes Lagern überreif gewordene Exemplare zeigten dagegen in den meisten Fällen wieder eine Abnahme der reduzierenden Eigenschaft. Wahrscheinlich dringt der Luftsauerstoff allmählich durch die Poren in die Frucht und wirkt dann bei längerer Lagerung zerstörend. Daß aber auch Zersetzungen durch Enzyme oder Mikroorganismen dabei eine Rolle spielen können wird später gezeigt werden.

Vermutlich hängt die Höhe des Reduktionsvermögens auch noch von den Witterungsverhältnissen ab, bei denen die Früchte gewachsen sind. Im Winter geerntete Früchte titrierten durchschnittlich weniger als im Sommer gereifte. Der Unterschied war jedoch nicht hervorstechend. Es wurde auch versucht, durch künstliche Ultraviolettbestrahlung der ganzen Früchte das Reduktionsvermögen zu erhöhen, ohne aber brauchbare Resultate zu erzielen.

Die folgenden Angaben über die Verteilung des Reduktionsvermögens in der Frucht selbst gelten für normale Durchschnittsfrüchte im Gewichte zwischen 100 und 130 g, so wie sie zum Verkauf gelangen.

Man unterscheidet bei Zitronen und Orangen Fruchtfleisch und Schale. Die Schale teilt man wieder ein in die innere weiße Schale, Albedo genannt, und die äußere gelbe, das Flavedo.

Das Gesamtreduktionsvermögen einer Frucht bewegt sich zwischen 800—1000 ccm n/1000 Farblösung. Davon entfallen nur ungefähr 30—35% auf den im Fruchtfleisch enthaltenen Saft. 65 bis 70% befinden sich in der Schale. Von diesen sind annähernd $^2/_3$ im Flavedo und $^1/_3$ im Albedo. Diese Verhältnisse wird man bei allen normalen Früchten wieder finden, wenn sich auch die absoluten Werte mit der Größe der Früchte ändern. Eine Verschiebung der Prozentzahlen kann bei zu alten Früchten eintreten. In der schon weiter oben erwähnten Arbeit von A. L. Bacharach, P. M. Cook und E. L. Smith (2) errechnen sich aus den angegebenen Werten für die süße Orange („sweet orange") fast die selben Verhältniszahlen.

Die scheinbaren Aequivalentgewichte des Saftes sowie der aus den Schalen erhaltenen Auszüge sind folgende: das des Saftes schwankt zwischen 15 000—18 000, das der inneren Schale zwischen 7000—9000, und das der äußeren innerhalb 2800—4000. Danach dürfte für die Lösung der gestellten Frage die äußere Schale bei weitem am günstigsten sein, und von nun ab wird nur noch von dieser die Rede sein.

c) Beobachtungen und Versuche, die darauf hinweisen, daß es sich bei dem reduzierenden Körper um Vitamin C handelt.

Bekanntlich ist die hervorstechendste Eigenschaft des Vitamin C seine äußerst leichte Oxydierbarkeit, sobald es in Lösung ist. Bei allen Auszügen, die gemacht wurden, zeigte sich eine verhältnismäßig rasche Abnahme des Reduktionsvermögens, sobald sie mit Luft in Berührung kamen. Schalen, die vor dem Auszug an der Luft zerkleinert wurden, um in kurzer Zeit eine höhere Ausbeute an Reduktionswert zu erhalten, lieferten trotzdem schlechtere Auszüge als nicht zerkleinerte Schalen. Die kurze Zeit des Zerkleinerns hatte bereits genügt, einen ansehnlichen Teil des reduzierenden Stoffes durch Luftsauerstoff zu zerstören. Das ist ganz erklärlich, da einmal die frischen Schalen durch ihren natürlichen Gehalt an Wasser ziemlich feucht sind und zum anderen nach der Zerkleinerung dem Luftsauerstoff eine große Angriffsfläche bieten.

Eine weitere bekannte Tatsache ist folgende. Leitet man durch Lösungen von Vitamin C Luft, dann verschwindet der Reduktionswert vollständig, und zwar schneller in alkalischer als in saurer Lösung. Stammler (6) hat hierüber bereits Versuche gemacht mit Zitronensaft, von dem wir wissen, daß sein gesamtes Reduktionsvermögen vom Vitamin C herrührt.

Zu denselben Ergebnissen kommt man auch mit den Schalenauszügen. Von zwei Lösungen mit dem Anfangstitrationswert 70 ccm n/1000 Farblösung wurde die eine ganz schwach mit Schwefelsäure angesäuert, die andere schwach alkalisch gemacht. Bei letzterer war kurz nach Zugabe der Lauge das Reduktionsvermögen, nachdem zur Titration die entnommene Probe schwach angesäuert worden war, bereits auf 50 ccm n/1000 Farblösung abgesunken. Durch beide Lösungen wurde bei schwachem Erwärmen gleichmäßig Luft durchgeleitet. Schon nach einer Stunde verbrauchte die alkalische Lösung nur noch 1 ccm n/1000 Farblösung. Zur selben Zeit betrug der Titrationswert der sauren Lösung noch 27 ccm n/1000 Farblösung, um nach weiteren 30 Min. auf 10 ccm abzusinken und schließlich auch bis auf einen unbedeutenden Restwert zu verschwinden.

Bei allen Pflanzenauszügen, die Farblösung entfärben, kommen außer Vitamin C hauptsächlich nur noch Gerbstoffe und gerbstoffähnliche Körper in Frage. Auf Grund des Titrationsverlaufes kann man schon mit großer Wahrscheinlichkeit sagen, um was es sich handelt. Vitamin C titriert glatt bis zum Endpunkt mit keinem oder kaum merklichem „Ziehen" *) kurz vor dem Umschlag, und liefert, was sehr wichtig ist, im roten wie im blauen Gebiet des Farbstoffes gleiche Werte. Ein Verdunkeln des Eigenfarbtones der Lösung ist während der Titration von Vitamin C haltigen Auszügen nicht zu bemerken. Gerbstoffe dagegen „ziehen" während der Titration, eine Erscheinung, die gegen Ende immer stärker wird. Gleichzeitig tritt ein auffälliges Dunklerwerden der Lösung ein. Auch sind die Werte im blauen Farbstoffgebiet höher als im roten.

Auszüge von frischen Zitronen- oder Orangenschalen titrierten stets glatt bis zum Endpunkt und lieferten in beiden Farbstoffgebieten stets gleiche Werte. Ein Verdunkeln des Lösungsfarbtones wurde nie festgestellt. Ein leichtes „Ziehen" war nur beim Titrieren von Auszügen aus älteren Schalen zu beobachten.

Einen weiteren Hinweis, daß es sich bei den Schalenauszügen um Vitamin C handelt, liefert die Prüne-Titration nach Beier (7). Sie ergibt, in beiden Modifikationen ausgeführt, dieselben Werte wie die Indophenoltitration. Beispiel: 1 ccm des verwendeten Auszugs titrierte 5,4 ccm n/1000 Farblösung.

1. Titration in der Hitze. 1 ccm des Auszuges wurde mit 7 ccm n/1000 Prüne-Lösung versetzt und nach der Vorschrift von

*) „Ziehen": die Fähigkeit einer scheinbar austitrierten Lösung, nach einiger Zeit neue Farblösung zu entfärben.

Beier behandelt. 1,7 ccm n/1000 Titanlösung mußten bei der Rücktitration bis zur Entfärbung zugelassen werden. Also wurden 5,3 ccm n/1000 Prüne-Lösung verbraucht.

2. Titration bei Zimmertemperatur. 1 ccm des Auszuges wurde mit 7 ccm n/1000 Prüne-Lösung versetzt und nach Vorschrift von Beier behandelt. 3,5 ccm wurden zurücktitriert, also 3,5 ccm Prüne-Lösung verbraucht. Dieser Wert entspricht nach der Beier'schen Kurve 5,3 ccm n/1000 Indophenollösung. Erklärend sei hierzu gesagt, daß bei der Titration der Prüne-Lösung, wie von Beier (7) festgestellt wurde, in der Hitze die Reaktion dieses Farbstoffes mit dem Vitamin C quantitativ zu Ende geht, während sich bei Zimmertemperatur nach einer bestimmten Zeit nur ein Gleichgewicht, aber immer dasselbe, einstellt.

Die Tatsache nun, daß die Prüne-Titration nach beiden Modifikationen in diesem Falle übereinstimmende Werte ergibt, macht es ebenfalls sehr wahrscheinlich, daß es sich um Vitamin C handelt. Würden Gerbstoffe als Ursache des Reduktionsvermögens vorhanden sein, so würde man keine übereinstimmenden Werte erhalten. Diese würden in der Hitze infolge Hydrolyse höhere Zahlen liefern als in der Kälte, oder überhaupt erst in der Hitze erfaßt werden und in der Kälte garnicht reagieren, was sich auch in nicht übereinstimmenden Ergebnissen zeigen würde. Auch wären bei Anwesenheit von Gerbstoffen in nennenswerter Menge die Indophenolwerte von den Prüne-Werten verschieden.

Parallelversuche mit Lösung von reiner Askorbinsäure zeigten, daß sich diese gegenüber Prüne genau so wie der Schalenauszug in obigem Beispiel verhält.

d) Zerstörung des Reduktionsvermögens durch Einwirkungen von Enzymen oder Mikroorganismen.

Die außerordentliche rasche Abnahme des Reduktionsvermögens an der Luft liegender Schalen ließ vermuten, daß es sich hierbei nicht allein um die Einwirkung des Luftsauerstoffs handele, sondern daß gewisse Stoffe, Enzyme oder Mikroorganismen vorhanden sein müssen oder aus der Luft hinzu kommen, welche die zerstörende Wirkung des Sauerstoffes beschleunigen. Bestärkt wurde diese Meinung noch dadurch, daß frische Schalenauszüge, nachdem sie unter Stickstoff gesetzt waren, trotzdem noch, wenn auch bedeutend langsamer, an Reduktionsvermögen einbüßten.

Andererseits muß jedoch auch gesagt werden, daß Lösungen,

die schon verschiedene Behandlungen erfahren hatten, und in denen dann weder Enzyme noch Mikroorganismen vorhanden sein konnten, schwer auf konstantem Reduktionswert zu halten waren, sondern immer eine langsame Abnahme zeigten. Daß diese Abnahme durch Mikroorganismen, die beim Oeffnen der Gefäße ja immer in diese hinein gelangen können, verursacht wird, liegt durchaus im Bereich der Möglichkeit.

Um die enzymatische Wirkung durch den Versuch zu bestätigen, wurden Schalen 90 Min. lang auf 110 Grad erhitzt (unter N_2), um so die Enzyme zu zerstören. Die Schalen müßten konstantes Reduktionsvermögen bewahren, zumindest aber viel langsamer abnehmen als nicht erhitzte, auch unter Stickstoff aufbewahrte Schalen. Dies konnte durch den Versuch bestätigt werden.

Versuch: 93 g Schalen wurden wie oben gesagt behandelt. Das Gewicht betrug nach dem Erhitzen noch 86 g, sodaß 4,6 g erhitzter Schalen 5 g frischen entsprachen. Es wurden täglich Auszüge gemacht und diese mit n/1000 Farblösung titriert. Parallel dazu wurden von nicht erhitzten Schalen Auszüge hergestellt. Erhitztes und nicht erhitztes Material wurde unter Stickstoff im Eisschrank aufbewahrt.

4,6 g bzw. 5 g Schalen wurden mit 80 ccm n/50 Schwefelsäure 10 min. lang unter Stickstoff gekocht, nach dem Erkalten abgepreßt, die Lösung auf 100 ccm aufgefüllt und davon 20 ccm titriert. Die Ergebnisse zeigt folgende Tabelle:

Versuchstag:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Verbrauch an ccm n/1000 F.L.								
erhitzte Schalen	12,6	9,1	8,8	7,1	5,3	5,0	4,3	3,6	2,6
nicht erhitzte Schalen	8,5	1,8	1,1	0,2	0,2	0,2	—	—	—

Nach einigen Tagen war bei den nicht erhitzten Schalen und etwas später auch bei den erhitzten der Beginn der Verdorbenheit zu bemerken. Die Titration wurde dann auch „ziehend". Da bei dem behandelten Material die Enzyme und Mikroorganismen aber vorher sicher durch das Erhitzen zerstört waren, konnten nur neue Bakterien hinzugekommen sein, welche die Verdorbenheit bewirkten. Die Schalen enthielten auch noch einen genügenden Prozentsatz Wasser, der ja für das Gedeihen von Bakterien notwendig ist. Sicher sind also auch Bakterien für den Abfall des Titrationswertes trotz Erhitzens mit verantwortlich zu machen. Es müßten demnach Schalen, die bis zur vollständigen Trockne erhitzt

sind, konstantes Titrationsvermögen bewahren, da sie nun neu hinzukommenden Bakterien keine Lebensmöglichkeiten mehr bieten. Tatsächlich bewahren bis zur Trockne erhitzte Schalen konstantes Reduktionsvermögen.

Versuch: 97 g frische Schalen im Stickstoffvakuum und kochendem Wasserbade vollständig getrocknet, lieferten so 18,5 g trockenes Produkt, das für die Dauer des Versuches unter Stickstoff aufbewahrt wurde. 0,95 g trockene gleich 5 g frischen Schalen wurden in Abständen von ein oder mehreren Tagen 10 Min. mit 80 ccm 1%iger Essigsäure unter Stickstoff behandelt. Nach Erkalten und Abpressen wurde auf 100 ccm aufgefüllt und davon 10 ccm titriert. Noch nach einem Monat war keine Veränderung des Reduktionswertes, der nur wenig innerhalb der Fehlergrenzen schwankte, festzustellen.

3. Die Reindarstellung des reduzierenden Stoffes.

Bevor auf die einzelnen Stufen des Reinigungsganges eingegangen wird, sei ganz kurz der zum Ziel eingeschlagene Weg geschildert. Es wurden Auszüge gemacht, und diese unter besonderen Vorsichtsmaßregeln auf die jeweilig günstigsten Konzentrationsverhältnisse gebracht. Dann wurden mit Lösungsmitteln beziehungsweise Lösungen Fällungen vorgenommen. Auf diese Weise wurden verunreinigende Ballaststoffe ausgeschieden, und der reduzierende Stoff schließlich so weit angereichert, daß er zur Kristallisation gebracht werden konnte.

In dem folgenden Teile werden der Reihe nach sämtliche Operationen besprochen, so wie sie sich beim Isolierungsgange ergeben haben.

a) Auszüge.

Um die Aussichten auf das Gelingen des Versuches, den reduzierenden Stoff zu isolieren, zu steigern, wurde nach den günstigsten Extraktionsmethoden gesucht. Dabei ist vor allem auf zweierlei zu achten. Erstens kommt es darauf an, eine möglichst gute Ausbeute an Reduktionsvermögen zu erhalten. Zweitens aber ist es noch viel wichtiger, zu versuchen, von vornherein mit einem möglichst niederen scheinbaren Aequivalentgewicht den Reinigungsgang zu beginnen. Aus diesem Grunde können auch nur ganz frische Schalen verwendet werden. Längere Zeit hindurch gesammelte Schalen liefern schlechte Auszüge, da sie während des Lagerns einen großen Teil ihres Reduktionsvermögens ver-

lieren, wie oben bereits dargelegt worden ist. Von der großen Anzahl der gemachten Auszüge zeigten sich die wässrigen am günstigsten. Sie liefern eine befriedigende Ausbeute bei gutem Aequivalentgewichte. Heiße sowohl wie kalte Auszüge waren gleichwertig. Bei den heißen wurden 10 g Schalen mit 80 ccm Wasser 10 Min. unter Durchleiten von Stickstoff gekocht. Dann wurde unter Stickstoff erkalten lassen, und das Filtrat der Schalen auf 100 ccm aufgefüllt. Davon wurden jeweils 10 ccm titriert. Die kalten Auszüge werden hergestellt, indem 10 g Schalen mit 80 ccm Wasser unter Stickstoff 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen werden. Diese Zeit ist ausreichend, um praktisch den größten Teil des Reduktionsvermögens in die Lösung treten zu lassen. Eine noch längere Auszugszeit hat keinen Zweck, da das Reduktionsvermögen der Lösung kaum noch erhöht wird, sondern eher wieder absinkt, und da nur noch Ballaststoffe in Lösung gehen, die das scheinbare Aequivalentgewicht unnötig erhöhen. Bei Orangenschalen ist sogar eine Auszugszeit von 4 Stunden voll ausreichend.

An Hand der wässrigen Auszüge wurde auch festgestellt, daß es unnötig ist, vor dem Ausziehen die Schalen noch besonders zu zerkleinern. Man verwendet sie am besten so, wie sie beim Schälen abfallen.

Die bereits einmal ausgezogenen Schalen liefern zwar bei einem zweiten Auszug noch eine annehmbare Menge Reduktionsvermögen, aber ein schlechtes Aequivalentgewicht, sodaß sie für das Isolieren des reduzierenden Stoffes weniger geeignet sind und auch niemals für diesen Zweck verwendet wurden.

Zum Beispiel lieferte eine bestimmte Menge Schalen beim ersten Auszug ein Reduktionsvermögen von 820 ccm n/1000 Farblösung mit einem scheinbaren Aequivalentgewicht von 2800. Der zweite Auszug ergab einen Reduktionswert von 250 ccm n/1000 Farblösung aber mit dem Aequivalentgewicht von 3800. Es wäre unsinnig, das gute Aequivalentgewicht von 2800 durch Zugabe von Lösung mit dem Aequivalentgewicht 3800 zu verschlechtern. Man würde wohl durch Ausfällen von Verunreinigungen wieder auf das bessere Aequivalentgewicht kommen, aber nur unter Verlust von Reduktionswert. Man hätte also nur unnötige Arbeit gehabt und dabei nichts gewonnen. Dazu wäre die angewendete Fällung für den weiteren Reinigungsgang verloren, denn die Erfahrungen haben gelehrt, daß besonders zu Beginn eines Reinigungsganges die Wiederholung einer Fällung, zum Beispiel der Acetonfällung, keinen oder nur ganz geringen Reinigungseffekt hat (s. S. 11/12).

Die Auszüge mit verdünnten Säuren ergaben im allgemeinen dieselben Werte wie die wässrigen. Allerdings sind sie auf Grund ihres niedrigeren p_H-Wertes länger haltbar als jene, die gegen Lackmus nur ganz schwach sauer reagieren.

An organischen Lösungsmitteln wurden für die Extraktion Aceton und Alkohol anzuwenden versucht. Beide lieferten jedoch keine besonders guten Lösungen.

Besser waren die Auszüge von kombinierten Lösungsmitteln, z. B. von einer Mischung aus Aceton und verdünnter Schwefelsäure.

In der Tabelle sind die Werte von verschiedenen Auszügen aus einheitlichem Material vergleichsweise zusammengestellt.

Lösungsmittel	Art der Extraktion	Verbrauch an ccm n/1000 F.L.	Trockensubstanz	Sch.Ae.Gew.
Wasser	10 Min. unter N_2 gekocht	30	0,0764	2550
	24 St. unter N_2 bei Zimmertemp.	31	0,0840	2700
	24 St. unter N_2 im Eisschrank	24	0,0680	2830
H_2SO_4 1%ig.	10 Min. unter N_2 gekocht	30	0,1040	3470
	24 St. unter N_2 bei Zimmertemp.	31	0,0896	2890
	24 St. unter N_2 im Eisschrank	27,4	0,1294	4700
Aceton	10 Min. unter N_2 gekocht	14	0,0420	3000
	24 St. unter N_2 bei Zimmertemp.	10	0,0384	3840
	24 St. unter N_2 im Eisschrank	9	0,0392	4350
60% Aceton + 40% H_2SO_4 1%ig.	10 Min. unter N_2 gekocht	30	0,0840	2800
	24 St. unter N_2 bei Zimmertemp.	28,6	0,0858	3000
	24 St. unter N_2 im Eisschrank	27	0,0896	3320

Danach sind also die wässrigen Auszüge die besten. Bei den ersten größeren Ansätzen wurden heiße wässrige Auszüge gemacht. Bei den späteren kamen wässrige Auszüge bei Zimmertemperatur in Anwendung, die mit 1% Essigsäure versetzt waren. Um nicht allzu große Flüssigkeitsmengen zu erhalten, wurde soviel Lösungsmittel angewendet, daß auf die Schalen von 3 Durchschnittsfrüchten ungefähr 100 ccm Flüssigkeit kamen.

Hier sei noch bemerkt, daß nach der Auszugszeit die Flüssigkeit einfach von den Schalen abgegossen wurde, ohne diese noch besonders abzupressen. Das Abpressen ist ungünstig, weil es das scheinbare Aequivalentgewicht unnötig erhöht, da hierbei ein an Trockensubstanz verhältnismäßig hochprozentiger Saft abfließt.

Durchschnittlich hatten die so gewonnenen Auszüge einen Trockensubstanzgehalt von 2,8% und ein scheinbares Aequivalentgewicht von rund 3000.

b) Das Eindampfen der Auszüge.

So unbedeutend das Eindampfen der frischen Auszüge auch erscheinen mag, so muß doch hier etwas darüber gesagt werden. Es ist in diesem Falle so wichtig, weil bei unrichtiger Ausführung das Gelingen des ganzen Versuches in Frage gestellt wird. Es kommt darauf an, die Lösung zu konzentrieren, ohne dabei an Reduktionsvermögen zu verlieren.

Von Anfang an wurden die Auszüge im Stickstoffvakuum in fast kochendem Wasserbade eingedampft. Anschließend wurde, ohne das Reduktionsvermögen nachzuprüfen — weil bei der Dickflüssigkeit der Lösung genauere Werte nur schwer zu erhalten waren — die Acetonfällung ausgeführt. Immer war die Fällung im Hinblick auf das scheinbare Aequivalentgewicht erfolglos. Nachdem längere Zeit vergeblich versucht wurde, das Resultat günstiger zu gestalten durch Konzentrationsänderungen der zur Fällung gelangenden Lösung, wurde unter anderem auch einmal das Reduktionsvermögen am Schluß des Eindampfens nachgeprüft. Da zeigte sich, daß schon während des Eindampfens 15%, in manchen Fällen sogar bis 20% des Reduktionswertes auf irgend eine Weise verloren gegangen waren. Um diesen Verlust zu beheben, wurde zunächst bei niedrigerer Wasserbadtemperatur eingedampft. Bei 65 Grad lagen die Verluste nur noch in der Gegend von 10%. Die Anwendung noch niedrigerer Temperaturen konnte die Verluste nicht weiter verringern. Auch ein Zusatz von Zyankali als Enzymgift konnte den Verfall des Reduktionswertes während des

Eindampfens ebenso wenig aufhalten wie kurzes vorheriges Einleiten von Schwefelwasserstoff.

Einen völlig befriedigenden Erfolg brachte schließlich das Ansäuern der Lösungen mit Schwefelsäure. Von der Ueberlegung ausgehend, daß im stärker sauren Gebiet das Reduktionsvermögen besser haltbar ist, und daß beim Eindampfen die vorhandene Essigsäure leicht mit übergeht, wurden vorher die Lösungen n/10 schwefelsauer gemacht. Nun traten beim Einengen gar keine oder nur ganz geringe Verluste ein. Die Ursache des Rückganges des Reduktionsvermögens ist also nach aller Wahrscheinlichkeit darin zu sehen, daß im Laufe der Vakuumdestillation tatsächlich die in den Extrakten immer vorhandene Essigsäure abdestillierte. Hierdurch wurde das p_H der Lösung nach dem Neutralpunkt hin verschoben und damit die Oxydationsempfindlichkeit des reduzierenden Körpers ungeheuer gesteigert.

Die Verwendung von Schwefelsäure während des Konzentrierens hat noch den Vorteil, daß die Lösung beim allmählichen Steigen des Trockensubstanzgehaltes bis zu 35% verhältnismäßig noch dünnflüssig bleibt, was für die folgende Acetonfällung günstig ist.

Der Grund, weswegen nicht von vornherein der Auszug mit n/10 Schwefelsäure gemacht wird, ist der, daß infolge ihrer auflockernden Wirkung auf pflanzliche Gewebe die Schwefelsäure leicht Auszüge mit schlechterem Aequivalentgewicht liefert, wie auch schon die Tabelle auf Seite 9 andeutet. Diese Gefahr wird durch die verdünnte Essigsäure vermieden, die gleichgute Auszüge liefert wie Wasser, und die gleichzeitig das für die bessere Haltbarkeit des Reduktionsvermögens nötige p_H liefert, solange die Lösung nicht längere Zeit erhitzt wird.

c) Die Acetonfällung.

Die Lösungen, die bei den ersten Acetonfällungen verwendet wurden, waren sämtlich ohne Schwefelsäure eingedampft worden, also nur mit Essigsäure. Es konnte auch nur bis zu 25% Trokkensubstanzgehalt eingeengt werden, da die Lösungen bei dieser Konzentration schon ganz zähflüssig geworden waren und sich nur schwer mit dem zugegebenen Aceton mischten. Die aus Begleitstoffen bestehende Fällung fiel dadurch sehr grob aus und verursachte durch Einschluß einen bedeutenden Verlust an Reduktionsvermögen, der zusammen mit dem Verlust beim Einengen die Reinigungswirkung der ganzen Fällung zunichte machte. Durch nochmaliges Aufschlämmen des Niederschlages in Wasser und

neues Fällen mit Aceton konnte zwar der größte Teil des darin enthaltenen Reduktionsvermögens wieder gewonnen werden, aber mit einem derartig schlechten Aequivalentgewicht, daß ein weiteres Aufarbeiten dieser Lösungen aussichtslos erschien. Sowohl Versuche mit verschiedenen Trockensubstanzgehalten der Ausgangslösungen, wie auch Abänderungen der zur Fällung verwandten Acetonmengen — gewöhnlich wurden die Lösungen mit ihrem fünffachen Volumen Aceton versetzt — ergaben keine besseren Erfolge.

Ganz anders verhielten sich die mit Schwefelsäure eingedampften Lösungen. Wie schon oben gesagt, konnte hier ohne Schwierigkeiten bis zu einem Gehalt von 35% Trockensubstanz eingeengt werden. Die Lösungen waren noch verhältnismäßig dünnflüssig und mischten sich leicht mit Aceton. Die Fällung war entsprechend feinflockig und der Erfolg zufriedenstellend. Die Lösungen wurden mit dem fünffachen Volumen Aceton versetzt. Man muß anfangs das Aceton langsam und unter stetigem Umschütteln zufließen lassen, da sonst auch leicht eine grobflockige und schlechtere Fällung zustande kommt.

Eine so ausgeführte Fällung setzt durchschnittlich das scheinbare Aequivalentgewicht um 1000—1200 herab, bei einer Ausbeute von rund 90%. Das Aequivalentgewicht liegt jetzt also bei 1800—2000.

Versuche, dieses Ergebnis noch weiter zu verbessern, etwa durch Aenderung der Konzentration der Lösung und durch Zugabe verschieden großer Mengen Aceton, blieben erfolglos. Man kann zwar bei weniger konzentrierten Lösungen die Ausbeute bis auf fast 100% steigern, jedoch auf Kosten des Aequivalentgewichtes, das dann weniger erniedrigt wird.

Die bei der Ausführung einer zweiten Acetonfällung entstehenden Niederschläge enthalten soviel Reduktionsvermögen, daß ein Reinigungseffekt überhaupt nicht erzielt werden kann.

d) Die saure Bleifällung.

Diese Fällung soll ebenfalls wie die Acetonfällung Verunreinigungen ausfällen. Nach den Angaben von Vaubel (4) über die saure Bleifällung beim Isolieren des Vitamins aus Hagebutten, zeigte schon dort diese Fällung nur eine geringe Reinigungswirkung bei immerhin beträchtlichen Verlusten an Reduktionsvermögen. Noch schlechter ist ihre Wirkung bei der Anwendung auf Extrakte aus Zitronen- oder Orangenschalen, und sie konnte trotz vieler Versuche in keiner Abänderung besonders nutzbringend verwertet werden.

Nach der Acetonfällung wurde das Aceton abgedampft und die Lösungen auf 25% Trockensubstanzgehalt eingestellt. Dann wurden bestimmte Mengen 10%iges Bleiacetat zugesetzt. Nach dem Absitzen des Niederschlages wurde die klare Lösung abgegossen, der Rest zentrifugiert. Zum Entbleien wurde Schwefelwasserstoff eingeleitet, nach Abfiltrieren des Niederschlages im Vakuum zur Trockne verdampft, der Rückstand wieder aufgenommen und auf Reduktionsvermögen und Aequivalentgewicht untersucht.

Bei Lösungen, die keine Schwefelsäure enthielten, setzte sich der Bleiniederschlag ziemlich langsam ab. Eine Reinigung wurde bei der Bleifällung niemals erzielt. Es traten nur Verluste an Reduktionsvermögen ein, die sogar in manchen Fällen das Aequivalentgewicht erhöhten.

Bei schwefelsäurehaltigen Lösungen setzte die Fällung ziemlich rasch ab. Die Verluste an Reduktionsvermögen betrugen auch hier bis zu 25%, ohne dabei eine Erniedrigung des scheinbaren Aequivalentgewichtes zu erreichen. Geringer waren die Verluste, wenn nur soviel Bleiacetat zugesetzt wurde, als zur Entfernung der Schwefelsäure notwendig war, die unbedingt für den weiteren Reinigungsgang beseitigt werden mußte.

Somit ist die Bleifällung hier nicht mehr als Reinigungsreaktion zu bewerten. Sie dient lediglich dazu, die Schwefelsäure unter möglichst geringen Verlusten zu beseitigen. Man hat dabei mit einer Ausbeute an Reduktionsvermögen von durchschnittlich 88—90% zu rechnen. Das scheinbare Aequivalentgewicht bleibt dann unverändert.

e) Die Aetherfällung.

Für den weiteren Reinigungsgang wird die Trockensubstanz in methanolische Lösung übergeführt. Vaubel (4) verwendet dabei gereinigten Sand, der zu der entbleiten Lösung zugesetzt wird und nach dem im Vakuum erfolgten völligen Eindampfen zur Trockne, mehrere Male mit Methanol ausgewaschen wird. Der Zusatz von Sand erwies sich hier als völlig unnötig. Lediglich mit 1% Eisessig wurden die Lösungen vor dem Einengen versetzt. Auch wurde die Badtemperatur bei 75 Grad Celsius gehalten. Bei höherer Temperatur waren oft Verluste eingetreten. Diese wurden bei der angegebenen Temperatur vermieden. Der völlig trockene Rückstand löste sich bis auf unbedeutende Reste bei geringem Erwärmen leidlich schnell in Methanol. Die Lösung wird nun auf 15% Trokkensubstanzgehalt eingestellt und mit ihrem vierfachen Volumen

absoluten Aethers langsam versetzt. Ueber die Zugabe des Aethers ist dasselbe zu sagen wie über das Zufließenlassen des Acetons bei der Acetonfällung. Schon nach verhältnismäßig kurzer Zeit kann von der Fällung restlos abgegossen werden. Nach Abdampfen des Aethers wird auf Reduktionsvermögen und scheinbares Aequivalentgewicht geprüft. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 65% und das Aequivalentgewicht wurde um 700—900 erniedrigt, liegt also nach dieser Fällung normaler Weise bei 1000—1300.

f) Die neutrale und acetonische Bleifällung.

Für diese Fällung muß die Trockensubstanz wieder in wässrige Lösung gebracht werden. Die methanolische Lösung wird mit 1% Eisessig versetzt und im Stickstoffvakuum bei 75 Grad Badtemperatur zur Trockne eingedampft, dann mit Wasser aufgenommen. Hierbei treten keine Verluste ein.

Der Gang der beiden Fällungen ist kurz folgender. Die auf bestimmten Trockensubstanzgehalt eingestellte Lösung wird mit Bleiessig (D.A.B. 6.) bis fast zum Neutralpunkt versetzt. Die auftretende Fällung, aus Verunreinigungen bestehend, wird möglichst rasch abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wird abgegossen und sofort mit ihrem doppelten Volumen Aceton versetzt. Dabei wird vor allem der reduzierende Stoff als Bleisalz mit niedergeschlagen. Wieder wird rasch abzentrifugiert, die Lösung abgegossen, der Niederschlag in reinstem Aceton aufgeschlämmt und schließlich mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Nach dem Abdampfen des Acetons und Vertreiben des Schwefelwasserstoffs kann auf Reduktionsvermögen und scheinbares Aequivalentgewicht geprüft werden.

Bei diesen eben beschriebenen Fällungen ist besonders darauf zu achten, daß bei der Neutralisation mit Bleiessig peinlichst unter Stickstoff gearbeitet wird, da die Lösung bis fast an den Neutralpunkt herankommt, wo ja bekanntlich der reduzierende Stoff gegen Sauerstoff außerordentlich empfindlich ist.

Als günstigte Lösungskonzentration wurde, wie auch Vaubel (4) bei seinem Hagebuttenversuch angibt, ein Trockensubstanzgehalt von 7—8% festgestellt. Nun wird bis fast zum Neutralpunkt Bleiessig zugesetzt. Um dabei einen Ueberschuß zu vermeiden, gebe man in kleinen Anteilen den Bleiessig zu und prüfe immer nach Absitzen des Niederschlages die überstehende Lösung mit Lackmuspapier.

Bei den ersten Versuchen wurde fast vollkommen neutralisiert. Der Reinigungseffekt war dabei immer sehr gut, aber die

Verluste betrugen durchschnittlich 80%. Neutralisiert man aber nicht soweit, so sind die Verluste bedeutend geringer, und der Reinigungsgrad ist auch noch sehr gut.

Es wurde dabei wie folgt verfahren. Verbrauchten 10 ccm Lösung bis zum Neutralpunkt 3 ccm Bleiessig, so wurden nur 2,8—2,9 ccm zugesetzt. Die über dem Niederschlag stehende Lösung reagierte dann gegen Lackmus noch deutlich sauer, und die Ausbeute betrug im allgemeinen 50% des Reduktionsvermögens.

Aus der vom Niederschlag befreiten Lösung wird nun mit Aceton der reduzierende Körper als Bleisalz niedergeschlagen. Die Zugabe des doppelten Volumens Aceton ist am günstigsten. Bei Zusatz von mehr Aceton wird zwar durch weitere Ausfällung von Bleisalz die Ausbeute erhöht, aber der Reinigungseffekt bedeutend abgeschwächt.

Beide erörterten Fällungen müssen rasch hintereinander ausgeführt werden. Man verwende immer nur soviel Lösung, als man mit der zur Verfügung stehenden Zentrifuge schnell verarbeiten kann. Es hat keinen Zweck, bei größeren Lösungsmengen alles zusammen zu verarbeiten und auf das Absitzen der Niederschläge zu warten. Das wirkt sich ungünstig auf das scheinbare Aequivalentgewicht aus. Zudem setzt sich der Niederschlag nur sehr langsam ab. Wahrscheinlich zieht auch der Acetonniederschlag bei längerem Stehen Feuchtigkeit, und damit Verunreinigungen aus der überstehenden Lösung an.

Nach diesen Fällungen ist das scheinbare Aequivalentgewicht auf 300—500 abgesunken.

Lösungen mit derartigen scheinbaren Aequivalentgewichten kann man schon zur Kristallisation ansetzen, aber die Kristallausbeute ist, wie an Versuchen festgestellt wurde, gering. Es ist besser, in solchen Fällen die neutrale und acetonische Bleifällung zu wiederholen. Sie arbeitet bei der Wiederholung mit einer besseren Ausbeute, nämlich 65%, und erniedrigt das scheinbare Aequivalentgewicht auf mindestens 200.

g) Der Kristallisationsansatz.

Der nun folgende Kristallisationsansatz ist derselbe wie er von Vaubel (4) angegeben wird. Die in möglichst wenig Methanol gelöste Trockensubstanz wird mit frisch destilliertem Aether bis zur beginnenden Trübung und dann mit demselben Volumen Petroläther versetzt. Die Menge des Petroläthers braucht nicht genau eingehalten zu werden. Es scheidet sich ein klares, farbloses oder nur schwach gelblich gefärbtes Oel ab, das nach einigen Stunden

im Eisschrank zu kristallisieren beginnt. Bis zur völligen Kristallisation läßt man noch einen oder zwei Tage stehen. Dann gießt man die über den Kristallen stehende Flüssigkeit ab und wäscht dieselben einige Male mit einem auf —5 bis —10 Grad Celsius abgekühltem Gemisch aus 50% Methanol und ebensoviel Aether. Vaubel (4) verwendet hier an Stelle von Methanol Aceton. Die farblosen Kristalle werden im Stickstoffvakuum getrocknet.

h) Zusammenfassung des Arbeitsganges an Hand eines Beispieles.

Nachdem nun die einzelnen Fällungen dargelegt worden sind, sei an Hand eines Beispieles der ganze Gang zusammenhängend geschildert. Er ist gültig sowohl für Zitronen- als auch für Orangenschalen. Der einzige Unterschied für die beiden Ausgangsmaterialien ist die verschiedene Dauer der Auszugszeit. Als Beispiel ist die Reindarstellung des reduzierenden Stoffes aus Orangenflavedo gewählt. Aus untenstehender Tabelle kann man alle wichtigen Daten ablesen.

Zeile	Reinigungstufe	Flüssigkeitsmenge i. ccm	Gesamtreduktionsvermögen in ccm n/1000 F.L.	Gesamttrockenrückstand in g	Sch.Aeq. Gew.	Ausbeute an Reduktionsvermögen in %
1	Ektrakt	5700	57 000	160,74	2800	—
2	Nach der Acetonfällung	2500	50 000	97,00	1940	86,0
3	Vor der Aetherfällung	560	44 800	84,00	1875	89,6
4	Vor der 1. Neutralisation mit Bleiessig	500	32 500	36,50	1123	72,5
5	Vor der 2. Neutralisation mit Bleiessig	27,5	16 500	5,32	320	50,8
6	Vor der Kristallisation	20,0	10 500	1,82	173	64,2
7	Kristalle	—	6 829	0,601	88	65,0

Die Schalen von 180 Orangen wurden mit 6000 ccm einprozentiger Essigsäure 3½ Stunden lang ausgezogen. Dann wurde die Flüssigkeit abgegossen. Das Gesamtreduktionsvermögen betrug 57 000 ccm n/1000 Farblösung mit einem scheinbaren Aequivalentgewicht von 2800. Siehe Tabelle Zeile 1.

Nun wurde die Lösung durch Zusatz von 15 ccm konzentrierter Schwefelsäure n/10 schwefelsauer gemacht und im Stickstoffvakuum im Wasserbad von 65 Grad bis auf 460 ccm eingedampft. Das entspricht einem Trockensubstanzgehalt von 35%. Unter kräftigem Durchleiten von Stickstoff wurde das fünffache Volumen Aceton (2300 ccm) zuerst langsam, dann schneller, zugegeben. Der Niederschlag setzte sich rasch ab, und nach 3 St. konnte die völlig klare Lösung abgegossen werden. Den Reinigungseffekt zeigt die Tabelle S. 16 Zeile 2.

Das Aceton wurde zunächst unter gewöhnlichem Druck, zuletzt im Vakuum restlos vertrieben. Die zurückbleibende wässrige Lösung wurde auf 400 ccm (= 25% Trockenrückstand) mit Wasser verdünnt. Es wurden noch 15 ccm Eisessig zugesetzt und dann soviel 10%iges Bleiacetat, bis in der Lösung keine Schwefelsäure mehr nachzuweisen war. Ungefähr 400 ccm Bleiacetat wurden dazu benötigt. Der Niederschlag setzte sich rasch ab. Soweit wie möglich wurde abgegossen, der Rest zentrifugiert. Das überschüssige Bleisalz wurde in den vereinigten Lösungen durch Einleiten von Schwefelwasserstoff gefällt, der geringe Niederschlag abfiltriert, der Schwefelwasserstoff zum größten Teil mit Kohlensäure aus der Lösung verjagt, diese dann im Vakuum bei 65 Grad zur Trockne eingedampft und darüber hinaus noch eine Stunde bei derselben Wasserbadtemperatur im Vakuum gehalten. Praktisch ist alsdann kein Schwefelwasserstoff mehr vorhanden oder nur so wenig, daß das Titrationsresultat nicht fehlerhaft beeinflußt wird.

Der Rückstand wurde nun mit Methanol aufgenommen, und die üblichen Daten aufgestellt. Tabelle S. 16 Zeile 3.

Die auf 15% Trockensubstanzgehalt eingestellte Methanollösung von 560 ccm wurde mit dem 4fachen Volumen Aether (2300 ccm) unter denselben Vorsichtsmaßregeln wie bei der Acetonfällung versetzt. Sobald die Lösung klar war, konnte auch hier restlos abgegossen werden. Nach Abdestillieren des Aethers und des größten Teiles des Methanols wurde wieder im Vakuum bei 65 Grad zur Trockne eingedampft. Dann wurde mit Wasser aufgenommen und der Erfolg der Fällung nachgeprüft. Tabelle S. 16 Zeile 4.

Die 500 ccm messende Lösung hatte den für die folgende Fällung nötigen Trockensubstanzgehalt von 7,3%. Es konnten wegen der Größe der Zentrifugenröhrchen nur immer 20 ccm je Röhrchen davon verarbeitet werden. Diese wurden mit 5,4 ccm Bleiessig (D.A.B. 6.) versetzt. Die Menge des Bleiessigs muß dabei jeweils durch Vorproben festgestellt werden. Nun wurde der Nie-

derschlag rasch abzentrifugiert, die Lösung abgegossen, mit dem doppelten Volumen Aceton versetzt, der entstandene Niederschlag wieder abgeschleudert, und dieser nach Abgießen der überstehenden Flüssigkeit unter reinstem Aceton mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Die wiedervereinigten und vom Bleisulfidniederschlag befreiten Acetonlösungen wurden zur Trockne eingedampft und zum möglichst völligem Vertreiben des Schwefelwasserstoffs noch eine Stunde bei 65 Grad im Vakuum gehalten. Jetzt wurde mit reinstem Methanol wieder aufgenommen und der Reinigungseffekt bestimmt. Tabelle S. 16 Zeile 5.

Die Lösung mit dem scheinbaren Aequivalentgewicht 320 wurde noch nicht zur Kristallisation angesetzt aus den bereits oben erwähnten Gründen. Die neutrale und acetonische Bleifällung wurde wiederholt.

Nach dem Entbleien mit Schwefelwasserstoff wurde die klare Lösung im Vakuum zur Trockne gedampft und wie oben längere Zeit noch im Vakuum erwärmt. Schließlich wurde der Trockenrückstand in Methanol aufgenommen. Tabelle S. 16 Zeile 6.

Diese Lösung wurde zur Kristallisation verwendet. Zunächst wurde noch etwas überschüssiger Alkohol abdestilliert, um eine möglicht konzentrierte Lösung zu haben. Dann wurde frisch destillierter Aether bis fast zur beginnenden Trübung der Lösung zugegeben (das waren ca. 10 ccm), und darauf die gleiche Menge Petroläther. Ein schwach gelblich gefärbtes Oel schied sich ab. Die Lösung wurde in den Eisschrankt gestellt, und nach einigen Stunden zeigten sich schon die ersten Kristalle. Am anderen Tage wurde von den farblosen Kristallen abgegossen und diese im Kolben mehrmals mit einer auf —8 Grad Celsius gekühlten 50%igen Mischung von Methanol und Aether gewaschen, zum Schluß noch einmal mit reinem Aether abgespült, dann im Vakuum getrocknet und gewogen. Es waren 0,601 g. Tabelle S. 16 Zeile 7. Diese Menge entspricht einer Ausbeute von 12% des Ausgangsreduktionsvermögens.

So wurden auf gleiche Art aus den Schalen von nur 10 Orangen mit einem Anfangsreduktionsvermögen von 3605 ccm n/1000 Farblösung und einem scheinbaren Aequivalentgewicht von 2740 0,0390 g kristallisiertes Produkt erhalten. Das ist ebenfalls eine Ausbeute von 12,2%. Da man mit kleinen Mengen rasch arbeiten kann, war dieser Versuch schon nach 3 Tagen beendet.

Aus den Schalen von 300 Zitronen mit dem Anfangsreduktionswert von 99 750 ccm n/1000 Farblösung und dem scheinbaren Aequivalentgewicht 2840 wurden 0,7100 g Kristalle isoliert.

Die Ausbeute betrug hier 8,1%. Dieser Versuch wurde als erster ausgeführt, als noch nicht alle Fällungen geklärt waren, daher die geringere Ausbeute.

4. Der isolierte reduzierende Körper wird als Vitamin C identifiziert.

Nun wurden die chemischen und physikalischen Konstanten des isolierten Körpers bestimmt. Die Angaben gelten sowohl für das Orangen- als auch für das Zitronenschalenprodukt.

a) Schmelzpunkt.

Die Substanz schmilzt zwischen 183 und 184 Grad Celsius unter gleichzeitiger Gasentwicklung. Von ungefähr 165 Grad an aufwärts beginnt die Substanz sich allmählich gelb zu färben. Genau so verhält sich das von R. Vaubel (4) im selben Institut aus Hagebutten isolierte und als Vitamin C identifizierte Produkt, das zum Vergleich herangezogen wurde. Eine von der Firma E. Merck erhaltene Ascorbinsäure zeigte auch das gleiche Verhalten.

b) Bestimmung des Reduktions-Aequivalentgewichtes.

Eine genau abgewogene Menge wird in möglichst wenig mit Stickstoff gesättigtem Wasser gelöst und mit n/1000 Farblösung bis zum Umschlag titriert. Zweckmäßig ist es, vor der Titration einen Tropfen verdünnte Essigsäure zuzugeben und wieder mit festem Natriumacetat abzustumpfen, da, wie festgestellt wurde, eine derart behandelte Lösung des reinen Körpers besser und schneller zu titrieren ist.

Aus sieben Bestimmungen, die auf der Mikrowage eingewogen waren, wurde als Durchschnittswert für das Aequivalentgewicht 87,93 gefunden. Dieser Wert zeigt hinreichende Uebereinstimmung mit dem bisher von allen Forschern bestätigten Wert von 88 für das Reduktionsaequivalentgewicht.

c) Die spezifische Drehung.

Bei dieser Messung kam ein 100 mm Mikrorohr zur Verwendung. Die verwendeten Lösungen waren genau auf der Mikrowage unter Stickstoff eingewogen worden. Ihr Gehalt an kristallisiertem Produkt war ungefähr 2,5%. Von 6 so hergestellten Lösungen wurde für die spezifische Drehung als Mittelwert gefunden $(\alpha)_D^{24} = +21{,}5^0 \pm 0{,}4^0$ in Wasser. Auch sorgfältige Umkristallisation ergab keine Aenderung des Wertes. Dieselbe Drehung zeigten auch das Präparat von R. Vaubel (4) und das von der Firma E. Merck. Mutorotation konnte nicht beobachtet werden.

Die meisten Forscher (8) geben in der Literatur für Vitamin C eine spezifische Drehung von $(\alpha)_D = + 24^0$ an, also einen wesentlich höheren Wert. Sicher ist wohl der von uns gefundene Wert der richtigere. Dafür sprechen folgende Gründe. Produkte, die einen höheren Wert ergeben als den unsrigen, sind wahrscheinlich durch teilweise oxydierte Ascorbinsäure oder durch das Natriumsalz der Säure verunreinigt. Beide haben nämlich eine bedeutend höhere spezifische Drehung als die reine freie Ascorbinsäure. Zudem schreiben Herbert und Hirst (9), daß die spezifische Drehung der Ascorbinsäure in n/20 Salzsäure gemessen $(\alpha)_D^{17} = 22^0$ beträgt, während dasselbe Produkt in Wasser einen Wert von $+ 24^0$ ergibt. Bei Verunreinigung durch Natriumsalz ist der Wert von 22^0 zu erklären, da jenes durch die Salzsäure ausgeschaltet wird, was mit einer Erniedrigung der Drehung von 24^0 auf 22^0 in Einklang zu bringen ist. Unser Produkt dagegen in n/20 Salzsäure zur Messung gebracht ergab keine Abweichung von der in Wasser gefundenen Drehung. Herbert und Hirst (9) schreiben weiter, daß die spezifische Drehung der Ascorbinsäure in Natronlauge bedeutend höher liegt, daß aber der Wert nach dem Ansäuern sofort bis sogar auf 21^0 absinkt und hier konstant bleibt. Auch dieser Befund scheint ein Beweis dafür, daß die spezifische Drehung der freien Ascorbinsäure tiefer als 24^0 liegt. Gestützt wird der von uns gefundene Wert noch durch eine Veröffentlichung von K. Maurer und B. Schiedt (10), welche die d-Ascorbinsäure darstellten, die eine spezifische Drehung von $(\alpha)_D = -21{,}5^0$ zeigte. Optische Antipoden zeigen aber bekanntlich gleiche absolute Drehungen.

Hier sei noch kurz erwähnt, daß unser Produkt unter das Mikroskop gebracht dieselben Kristallbilder ergab wie sie A. Szent-Györgyi (11) für Ascorbinsäure veröffentlicht hat.

Nach all diesen gemachten Feststellungen dürfte kein Zweifel mehr vorhanden sein, daß es sich bei dem aus Orangen- und Zitronenschalen isolierten kristallinen Körper um Vitamin C handelt. Ein Tierversuch erscheint zur Erhärtung des Beweises überflüssig.

5. Zusammenfassung.

Zunächst werden Versuche qualitativer und quantitativer Natur beschrieben, die es wahrscheinlich machen, daß es sich bei dem reduzierenden Stoffe in Orangen- und Zitronenschalen um Vitamin C handelt. Um diese zu Anfang der Arbeit gestellte Frage endgültig zu beantworten, wird der reduzierende Körper rein dargestellt und als Vitamin C zu identifizieren versucht. Bei dieser

Identifikation mit Hilfe der bekannten physikalischen und chemischen Konstanten der Ascorbinsäure zeigt sich weitgehende Uebereinstimmung. Für die spezifische Drehung wird ein neuer Wert angegeben und begründet.

Die vorliegende Arbeit wurde im Universitäts-Institut für Nahrungsmittelchemie, Frankfurt a. M., auf Anregung des Institutsdirektors,

Herrn Prof. Dr. J. Tillmans,

unternommen und durchgeführt. Auch an dieser Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. J. Tillmans, meinem verehrten Lehrer sowie Herrn Dr. R. Strohecker und Herrn Dr. R. Vaubel für die jederzeit erteilten wertvollen Ratschläge und das Interesse, das sie meiner Arbeit entgegenbrachten.

Literaturverzeichnis.

(1) H. Nink, Inaugural-Dissertation, Frankfurt a. M. 1933.

(2) A. L. Bacharach, P. M. Cook und C. L. Smith, Biochemical Journal 28, 1038, 1934.

(3) J. Tillmans, P. Hirsch und W. Hirsch, Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel 1932, 63, 1.

(4) J. Tillmans, P. Hirsch und R. Vaubel, Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel 1933, 65, 2.

(5) J. Tillmans, P. Hirsch und F. Siebert, Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel 1932, 63, 21.

(6) H. Stammler, Inaugural-Dissertation, Frankfurt a. M. 1933.

(7) H. Beier, Inaugural-Dissertation, Frankfurt a. M., noch im Druck befindliche Arbeit.

(8) Ault, Baird, Carrington, Haworth, Herbert, Hirst, Perzival, Smith, Journal of Chemical Society, Oktober 1933, 1422. A. Szent-Györgyi, Biochemical Journal 1928, 22, 1387. F. Micheel, K. Kraft und W. Lohmann, Zeitschrift für physiologische Chemie 225. Bd. 1934.

(9) R. W. Herbert, E. L. Hirst, E. G. V. Perzival, R. J. W. Reynolds, F. Smith, Journal of the Chemical Society, 1933, 1279.

(10) K. Maurer und B. Schiedt, Ber. dtsch. chem. Ges. 67, 1239—41, 1934.

(11) A. Szent-Györgyi, Biochemical Journal 1928, 22, 1387.

Lebenslauf.

Am 12. Mai 1907 wurde ich, Erich Helm, in Wethau bei Naumburg (Saale) als Sohn des Zimmermeisters Paul Helm geboren. Nach Beendigung der Schulausbildung mit der Reifeprüfung des Reformrealgymnasiums zu Weißenfels, studierte ich anschließend von Ostern 1926 bis März 1928 in Halle Chemie. Die folgenden Semester bis einschließlich des Sommersemesters 1931 verbrachte ich an der Universität zu Frankfurt a. M., kehrte dann wieder nach Halle zurück, und legte dort im November 1932 das Verbandsexamen ab. Bis Mai 1933 unterbrach ich mein Studium. Darauf begann ich in Frankfurt a. M. unter der Leitung des Direktors des Universitäts-Institutes für Nahrungsmittelchemie, Herrn Professor Dr. J. Tillmans, die vorliegende Arbeit.